

[Date of request for examination]  
[Date of sending the examiner's decision of rejection]  
[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application converted

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-211379

(43) 公開日 平成4年(1992)8月3日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/55	Z N A			
1/21		7236-4 B		
C 1 2 P 13/02		6977-4 B		
// (C 1 2 N 15/55		8828-4 B	C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 9 (全 20 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-33236	(71) 出願人	591038107 別府 輝彦 東京都杉並区堀之内1丁目5番21号
(22) 出願日	平成3年(1991)2月27日	(71) 出願人	591038118 山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19番地の1
(31) 優先権主張番号	特願平2-48078	(72) 発明者	別府 輝彦 東京都杉並区堀之内一丁目5番21号
(32) 優先日	平2(1990)2月28日	(72) 発明者	山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19番地の1
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子D  
NA、これを含有する形質転換体

(57) 【要約】

【構成】 サブユニット $\alpha^{(H)}$ 、サブユニット $\beta^{(H)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA<sup>(H)</sup>。サブユニット $\alpha^{(L)}$ 、サブユニット $\beta^{(L)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA<sup>(L)</sup>。

【効果】 このニトリルヒドラーゼ遺伝子を菌体内に多コピー存在させ、菌体内酵素量を従来に比して飛躍的に増大させることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のサブユニット $\alpha^{(H)}$ 及び配列番号2のサブユニット $\beta^{(H)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA<sup>(H)</sup>。

【請求項2】 配列番号3のサブユニット $\alpha^{(L)}$ 及び配列番号4のサブユニット $\beta^{(L)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA<sup>(L)</sup>。

【請求項3】 サブユニット $\alpha^{(H)}$ 及びサブユニット $\beta^{(H)}$ が配列番号5及び配列番号6のDNA配列を有するものである請求項1記載の遺伝子DNA<sup>(H)</sup>。

【請求項4】 サブユニット $\alpha^{(L)}$ 及びサブユニット $\beta^{(L)}$ が配列番号7及び配列番号8のDNA配列を有する請求項2記載の遺伝子DNA<sup>(L)</sup>。

【請求項5】 請求項1～4記載のH遺伝子DNA又はL遺伝子DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA。

【請求項6】 請求項5記載の組換え体DNAで形質転換された形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からニトリルヒドラーゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラーゼの製造法。

【請求項8】 請求項6記載の形質転換体を培地に培養し、得られるニトリルヒドラーゼの作用によりニトリル類を対応するアミド類に転換するアミド類の製造法。

【請求項9】 請求項6記載の形質転換体を培養し、得られる形質転換体の培養液、分離菌体、菌体処理物又はこれらの固定化物をニトリル類に作用させ対応するアミド類を製造することを特徴とするアミド類の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はロドコッカス ロドクロウス(Rhodo- coccus rhodochrous) J-1株に由来し、ニトリル類を対応するアミド類に変換する能力を有するニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA、このDNAを含む組換え体DNA及び該組換え体DNAにより形質転換された形質転換体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ニトリル類を水和して相当するアミド類を生成させる酵素はニトリラーゼまたはニトリルヒドラーゼとして知られており、該酵素を産生する微生物として、例えばバチルス属、バクテリジューム属、マイクロコカス属及びプレバクテリウム属(特公昭62-21519号公報参照)、コリネバクテリウム属及びノカルジア属(特公昭56-17918号公報参照)、シェードモナス属(特公昭59-37951号公報参照)及びロドコッカス属、アルスロバクター属及びミクロバクテリウム属(特開昭61-192193号公報参照)、及びロドコッカス。ロドクロウス

(特開平2-470号公報参照)等の微生物を挙げる事ができる。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 遺伝子組換えの方法でクローン化されたニトリルヒドラーゼ遺伝子によるニトリル類の水和では、菌体内に同遺伝子を多コピー存在させることができるため、微生物の触媒能力を従来の方法に比して飛躍的に増大させることが期待できる。

【0004】 この遺伝子組換え方法に関し、ロドコッカス sp. N-774株(微工研条寄第1936号)に由来し、ニトリル類を対応するアミド類に変換する能力、すなわちニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNAに係る発明が先に本発明者の一人らによって提案されている(特願昭63-202779号)。本発明は、さらに芳香族ニトリル類の水和に対しても極めて高いニトリルヒドラーゼ活性を有するロドコッカス ロドクロウス J-1株前記特開平2-470号公報記載からニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを取り出し、これをベクターに組み込んで組換え体DNAとし、さらに微生物に形質転換し形質転換体を得て、本発明を完成するに至った。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、

1. 配列番号1のサブユニット $\alpha^{(H)}$ 及び配列番号2のサブユニット $\beta^{(H)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA<sup>(H)</sup>、
2. 配列番号3のサブユニット $\alpha^{(L)}$ 及び配列番号4のサブユニット $\beta^{(L)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA<sup>(L)</sup>、
3. サブユニット $\alpha^{(H)}$ 及びサブユニット $\beta^{(H)}$ が配列番号5及び配列番号6のDNA配列を有するものである上記1記載の遺伝子DNA<sup>(H)</sup>、
4. サブユニット $\alpha^{(L)}$ 及びサブユニット $\beta^{(L)}$ が配列番号7及び配列番号8のDNA配列を有する上記2記載の遺伝子DNA<sup>(L)</sup>、
5. 上記1～4記載のH遺伝子DNA又はL遺伝子DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA、
6. 上記5記載の組換え体DNAで形質転換された形質転換体、
7. 上記6記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からニトリルヒドラーゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラーゼの製造法、
8. 上記6記載の形質転換体を培地に培養し、得られるニトリルヒドラーゼの作用によりニトリル類を対応するアミド類に転換するアミド類の製造法、
9. 上記6記載の形質転換体を培養し、得られる形質転換体の培養液、分離菌体、菌体処理物又はこれらの固定化物をニトリル類に作用させ対応するアミド類を製造す

ることを特徴とするアミド類の製造法、に関する。

【0006】以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、下記(1)～(8)の工程により実施されるものである。

(1) ニトリルヒドラーゼの抽出精製とアミノ酸配列の部分的決定：

培養集菌したロドコッカス ロドクロウス J-1 (微工研条寄第1478号)株からその中に含有される2種類のニトリルヒドラーゼ (H酵素とL酵素と呼称する。)を抽出精製し、それぞれの酵素をさらに高速液体クロマトグラフィーを用いて各2つのサブユニット ( $\alpha$ 、 $\beta$ ) に分離する。そして、これらのサブユニットのN末端のアミノ酸配列の一部を決定する。各アミノ酸配列は配列番号9～12に示す通りである。

(2) ニトリルヒドラーゼのDNAプローブの作製：  
本発明においては、前記特願昭63-202779号明細書記載のロドコッカス sp. N-774株のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列が上記各 $\beta$ サブユニットと高い相同性を示したことより、同明細書記載の形質転換体JM105/pYUK121 (微工研条寄第1937号)を用いて、DNAプローブの作製を行った。すなわち、培養集菌したpYUK121を含有する形質転換体からpYUK121を抽出し、その中に含まれるロドコッカス sp. N-774株由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子 (配列番号13)を含むDNA断片を制限酵素SphI及びSalIで切断後抽出精製し、これを放射性同位元素でラベルし、プローブを作製する。

(3) ニトリルヒドラーゼ染色体DNAを含むDNA断片の調製：

ロドコッカス ロドクロウス J-1株から染色体DNAを分離し、これを制限酵素で切断後、サザンハイブリダイゼーション法 [Southern, E.M., J. Mol. Biol. 98, 503 (1975)、以下同様] により目的遺伝子を含むDNA断片を上記(2)のプローブを用いて検出する。

【0007】この工程で、プローブとハイブリダイズする鎖長の異なる2種類のDNA断片が選別される。

(4) 染色体DNA断片のベクターへの挿入：  
工程(3)で調製した染色体DNA断片をそれぞれベクターに挿入し、組換え体DNAのライブラリーを作製する。

(5) 形質転換体の作製及び組換え体DNAの選別：  
工程(4)で調製した組換え体DNAライブラリーによる形質転換体を作製し、その中から工程(2)で作製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション法 [R. Bruce Wallace, et al., Nuc. Ac. Res. 9, 879 (1981)、以下同様] により目的の組換え体DNAを含む形質転換体を選別する。更にサザンハイブリダイゼーションにより、目的組換え体DNAの再確認を行う。

【0008】選別された目的のプラスミドを各々 pNHJ10H及び pNHJ20Lと称する。

(6) 組換え体DNAの精製と制限酵素地図の作成：

工程(5)で得られた pNHJ10H及び pNHJ20Lを精製した後それを用いて制限酵素地図 (図1)を作成し、目的遺伝子の含まれている箇所を決定する。

(7) 塩基配列の決定：

工程(5)で得られた pNHJ10H及び pNHJ20Lの親株由来の染色体DNA断片から不要部分を制限酵素を用いて除去し、得られたDNA断片の全塩基配列 (配列番号14、15)を決定し、工程(1)で決定したアミノ酸配列から予想される塩基配列を含むことを再確認する。

(8) 形質転換体を用いたニトリルヒドラーゼの生産とニトリル類のアミド類への変換：

工程(5)で作製した形質転換体を培養し、得られたニトリルヒドラーゼ酵素を含む菌体をニトリル類を含む基質溶液と混合し、アミド類を生成させる。

【0009】なお、ロドコッカス ロドクロウス J-1株は微工研に微工研条寄第1478号 (FERM BP-1478)として、及び工程(5)で作製した pNHJ10Hを含有する形質転換体TG1/pNHJ10Hは微工研に微工研条寄第2777号 (FERM BP-2777)としてまた同じく工程(5)で作製したpNHJ20Lを含有する形質転換体TG1/pNHJ20Lは微工研に微工研条寄第2778号 (FERM BP-2778)として寄託されている。

【0010】また、上記工程で用いるベクターとしてはプラスミドベクター (例えば pAT153, pNP9, pHc624, pKC7等)、ファージベクター (例えば $\lambda$ gt11 (東洋紡績社製)、Charon 4A (Amersham社製)等)のいずれもが用いられる。また、上記工程で用いられる制限酵素としては、SphI、SalI、EcoRI、BamHI、SacI等であり、これらはいずれも市販 (宝酒造社製)されているものが用いられる。また、形質転換に用いる宿主生物としては E. coli JM105株あるいは E. coli TG1株が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではなく、他の宿主生物を用いることができる。

【0011】形質転換体の培養に用いる培地は通常の培地が用いられる。ニトリル類のアミドへの変換には、上記形質転換体の培養により得られるニトリルヒドラーゼの他に形質転換体の培養液、分離菌体、菌体処理物、粗酵素液が用いられる。また、本発明で対象とするニトリルとしては、例えば、前記特開平2-470号公報記載の芳香環を形成する炭素数が4～10の芳香族ニトリルおよび炭素数2～6の脂肪族ニトリルであり、具体的には、例えば4-、3-および2-シアノピリジン、ベンゾニトリル、2,6-ジフルオロベンゾニトリル、2-チオフェンカルボニトリル、2-フロニトリル、シアノピラジン、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、クロトニトリル、アセトニトリルおよび3-ヒドロキシプロピオニトリルなどを挙げることができる。

【0012】以下、実施例により詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により限定されるものでない。なお、実施例において下記の略語を用いた。

TE: Tris-HCl (10mM, pH7.8), EDTA (1mM, pH8.0)

TNE: Tris-HCl (50mM, pH8.0), EDTA (1mM, pH8.0), NaCl (50mM)

STE: Tris-HCl (50mM, pH8.0), EDTA (5mM, pH8.0), Sucrose (35mM)

2xYT 培地: 1.6%トリプトン、1.0%酵母エキス、0.5%NaCl

### 【0013】

#### 【実施例】

(1) ニトリルヒドラターゼの抽出精製とアミノ酸配列の部分的決定:

ロドコッカス ロドクロウス J-1株を培地 (酵母エキス 3g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L,  $\text{CoCl}_2$  0.01g/L, クロトンアミド 3g/L, pH7.2) に28℃で80時間培養した後、集菌し、この細胞 (50g) を破碎し、硫酸分画し、透析後遠心して上清みを取り、DEAE・セルロファイナクロマトグラフィー、フェニル・セファロースクロマトグラフィー、セファデックスG-150 クロマトグラフィー、オクチル・セファロース・クロマトグラフィーにかけ、2種類の活性画分を得て、これを透析して酵素液を得た。そして、この酵素液をそれぞれ高速液体クロマトグラフィーで逆相カラム (Senshu Pak VP-304-1251) [(株) センシュウ科学製] を用いて二つのサブユニット ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) に分離した。このサブユニットのN末端からのアミノ酸配列 ( $\alpha_1^{(H)}$ ,  $\beta_1^{(H)}$ ,  $\alpha_1^{(L)}$ ,  $\beta_1^{(L)}$ ) をアミノ酸シーケンサー [アプライドバイオシステム社製 470A] を用いて決定した。

【0014】 このアミノ酸配列の結果は配列番号9~12に示す通りである。

(2) ニトリルヒドラターゼのDNAプローブの作製: pYUK121 を含有するE. coli JM105株 (微工研条寄第1937号) を2xYT (50μg/mlアンピシリン含有) 培地 100mlで30℃で一夜 (12時間) 培養後、集菌し、TNEを加え再度集菌し、STEを8ml、リゾチームを10mg加え、0℃で5分間反応させ、0.25M EDTA 4ml加えて、更に室温で10% SDS 2ml, 5M NaCl 5mlを加え、0~4℃で3時間放置した。それを超遠心し、その上澄みに30%のPEG6000 を1/2 当量加え、0~4℃で一夜 (12時間) 放置し、再度遠心した後TNE に溶解して7.5mlとし、CsClを加えて遠心して除蛋白後、臭化エチジウム溶液を300~500mg/ml加えシールチューブに移し、熱シールし超遠心した。そして、ベリスタポンプで cccDNA を取り出し水飽和イソプロピルアルコールを等量以上加えて臭化エチジウムを除き、TEで透析し、精製したプラスミドpYUK121 約3mlを得た。

【0015】 このpYUK121 を制限酵素 Sph I と Sal I で切断し、作製したロドコッカス sp. N-774 株由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.07kbのDNA断片を抽出精製した。そして、このDNA断片を $^{32}\text{P}$ で放射能ラベルし、プローブを作製した。なお、このプローブの塩

基配列は配列番号13に示す通りである。

(3) ニトリルヒドラターゼ染色体DNAを含むDNA断片の調製:

ロドコッカス ロドクロウス J-1株を培地 (グルコース10g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L, 酵母エキス1g/L, ペプトン 7.5g/L,  $\text{CoCl}_2$  0.01g/L, 尿素7.5g/L, グリシン1%又はアンピシリン 0.2μg/ml, 水1L, pH7.2) 100mlに植菌して培養後、集菌し、TNEで洗浄後、TE10mlに懸濁し、0.25M EDTA 4ml、リゾチーム10~20mg、アクロモプロテアーゼ10~20mg及び10×SDS 10mlを加え、37℃で3時間放置した。次にフェノールを15ml加え、室温で15分間放置し、遠心し、その上層を採った。そして2.5M酢酸ナトリウム溶液0.7ml、ジエチルエーテルを加え遠心し、その上層を捨て、下層に2容量のエタノールを加え、棒でDNAを巻き取った。これをTE:エタノール (容積比) の2:8, 1:9及び0:10の各溶液に5分間づつひたし、2~4mlのTE (37℃) に溶かし、37℃で RNase Aと $T_1$ の混合物を10μL加えた。次にフェノールを等量加え、遠心後その上層を採り、エーテルを等量以上加え、また遠心し上層を捨て、下層をクロロホルムを少量添加した2LのTEで一晩透析した。更に2回目の透析を3~4時間かけて行い、粗染色体DNA標品約4mlを得た。

【0016】 次に、粗染色体DNA標品15μLに制限酵素 Sac I 2μL、該酵素用緩衝液 (10倍濃度) 3μL及びTE 10μLを加え37℃で1時間反応させた後、アガロースゲル電気泳動 (60V, 3時間) に供した。そして工程(2)で合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果約 6.0Kbと 9.4Kbの位置に上記プローブが強くハイブリダイズするDNA断片があることが見出された。

【0017】 そこで、粗染色体DNA標品15μLを前述と同様の方法で制限酵素 Sac I で切断した後、アガロースゲル電気泳動を行い、6.0Kbと 9.4KbのDNA断片を含むゲルを切り出した。これを、それぞれ3倍容量の8M NaCl 10% 溶液を加えて可溶化した後、6mm 径のGF/C濾紙 (Whatman製) の上にDNAを吸着させ、次いで6M NaCl 0.4含有TE 100μLを10回、更に95%エタノール 100μLを10回滴下し、3分間風乾させた。そして、これを 0.5ml エッペンドルフのチューブに移しTE 40μLを添加し、47℃, 30分間放置した後、遠心してその上澄み約40μLを分取した。この溶液の中に目的のニトリルヒドラターゼ染色体DNAを含む 6.0Kb DNA断片と 9.4Kb DNA断片がそれぞれ回収されたことになる。

【0018】 次の各工程の具体例は 6.0Kb DNA断片の例を述べるが、9.4Kb DNA断片の場合も同様である。

(4) 染色体DNA断片のベクターへの挿入:

プラスミド pUC19 10μLに対し、制限酵素 Sac I 2μL、該酵素用緩衝液 (10倍濃度) 3μL及びTE10μLを加え30℃で1時間反応させ、次に 0.25MEDTA 2μLを添加

して反応をとめ、更に1M Tris-HCl(pH 9)を7 $\mu$ L、BAP(細菌性アルカリホスファターゼ)3 $\mu$ L加えて65℃で1時間反応させた。これにTEを加えて全体を100 $\mu$ Lとし、等量のフェノールで3回抽出し、これにエーテルを等量加えて、下層を採り、これに3M酢酸ナトリウム溶液10 $\mu$ Lとエタノール250 $\mu$ Lを加え、-80℃で30分放置後遠心し、乾燥してTEに溶解した。

【0019】この様にSac Iで切断し、BAP処理したpUC195 $\mu$ Lと工程(3)で回収した6.0Kb DNA断片溶液40 $\mu$ Lを混合し、連結緩衝液6 $\mu$ L、6mg/ml ATP溶液6 $\mu$ L及びT4-DNAリガーゼ3 $\mu$ Lとを加え、4℃で一夜(12時間)反応させることによって目的遺伝子を含有する6.0Kb DNA断片をpUC19に挿入した組換え体プラスミド約60 $\mu$ Lを作製してDNAライブラリーとした。

#### (5) 形質転換体の作製及び組換え体DNAの選別:

E. coli TG1株(Amersham社製)を2xYT培地10mlに37℃で接種して12時間培養後、それを新規な2xYT培地に1%接種し、37℃で2時間培養した。そして遠心集菌後、冷50mM CaCl<sub>2</sub>溶液を5ml加え、0℃で40分放置後、再度遠心して、冷50mM CaCl<sub>2</sub>溶液0.25ml及び工程(4)で調製した組換え体プラスミドを含有する溶液60 $\mu$ Lを加え、0℃で40分放置後、42℃で2分間ヒートショックを与え0℃で5分放置して、2xYT培地10mlを加え、37℃で90分間振とう培養した後、遠心集菌した。これに2xYT培地1ml添加し菌体を充分懸濁させた後、その懸濁液を10 $\mu$ Lずつアンピシリン50 $\mu$ g/ml含有2xYT培地寒天2プレートに分注し、37℃で培養した。そして、プレート上に生育した形質転換体コロニーをコロニーハイブリダイゼーション法にてニトリルヒドラーゼ遺伝子を持つ形質転換体を選抜した。すなわちプレート中に培養した形質転換体をニトロセルロースフィルター上に移し、菌体を溶かしてDNAを固定した後、これを工程(2)作製のプローブで処理し、オートラジオグラフ法で目的の組換え体DNAを含むコロニーを選抜した。更に、この選抜したコロニーから組換え体プラスミドを抽出し、サザンハイブリダイゼーションによって上述のプローブとハイブリダイズさせ、選抜したコロニーが目的遺伝子を含む形質転換体であることを再確認した。

#### (6) 組換え体プラスミドの精製と制限酵素地図の作成:

工程(5)で選抜した形質転換体を2xYT(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含有)培地100mlに接種し、37℃で一夜(12時間)培養後、集菌し、TNEを加え再度集菌し、STEを8ml、リゾチームを10mg加え、0℃で5分間反応させ、0.25M EDTA 4ml加えて、更に室温で10% SDS 2ml、5M NaCl 5mlを加え、0~4℃で3時間放置した。それを超遠心し、その上澄みに30%のPEG6000を1/2当量加え、0~4℃で一夜(12時間)放置し、再度遠心した後TNEに溶解して7.5mlとし、CsClを加えて遠心して除蛋白後、臭化エチジウム溶液を300~500mg/ml加えシールチューブ

に移し、熱シールし超遠心した。そして、ペリスタポンプでcccDNAを取り出し水飽和イソプロピルアルコールを等量以上加えて臭化エチジウムを除き、TEで透析し、精製した組換え体プラスミド約3mlを得た。これをpNHJ10Hと命名した。なお、9.4kb DNA断片の場合はpNHJ20Lと命名した。

【0020】この組換え体プラスミドを、制限酵素EcoRI、BamHI、PstI、SacI及びSalI等を用いて切断し、図1に示される制限酵素地図を作製した。

#### 10 (7) 塩基配列の決定:

pNHJ10Hの親株由来のDNA断片のどの部分に目的遺伝子が位置しているかを工程(6)で作成した制限酵素地図とサザンハイブリダイゼーションによって決め、不要部分を制限酵素PstIとSalI(pNHJ20Lの場合はEcoRIとSacI)にて切り縮め、6.0Kbの鎖長を1.97Kb(pNHJ20Lの場合は9.4Kbを1.73Kb)とした。そしてこの得られたDNA断片の全塩基配列をM13ファージベクターを用いたサンガー法Sanger, F. Science 214, 1205-1210(1981)により決定した。その結果、この親株由来のDNA断片の塩基配列は配列番号14(pNHJ20Lの場合は配列番号15)に示す通りであった。

【0021】なお、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、工程(1)で決定したアミノ酸配列と完全に一致することが確認され、このDNA断片に $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニット遺伝子の両方が存在することが明らかとなった。

#### (8) 形質転換体を用いたニトリルヒドラーゼ生産とニトリル類のアミド類への変換:

TG1/pNHJ10HおよびTG1/pNHJ20L株をそれぞれ2xYT(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含有)培地10mlに接種し30℃で一夜(12時間)培養し、この培養物を2xYT(50 $\mu$ g/mlアンピシリン、0.1g/l CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O含有)培地10mlに1%宛接種し、30℃で4時間培養し、これに終濃度が1mMとなるようにIPTGを添加し、更に30℃で10時間培養した。集菌後、この菌体を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.5)5mlに懸濁し、5分間超音波処理により菌体を破碎後、遠心分離(12,000G 30分)した。得られた上清液、50mMリン酸カルシウム緩衝液(pH7.5)および6mMベンゾニトリルを含有する混合液(12ml)を20℃、30分反応後、0.2ml 1MHC1を添加して反応を止めた。なお、対照試験として、上記形質転換体に代えて、E. coli TG1株のみを用いて同様に行った。反応終了後、反応液中の生成ベンズアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて検出した。その結果、宿主E. coli TG1株ではベンズアミドが検出できなかったが、形質転換体TG1/pNHJ10HおよびTG1/pNHJ20L株では、それぞれ、 $1.75 \times 10^{-3}$ および $6.99 \times 10^{-3}$  units/mgの酵素活性が認められた。

【0022】ここで、unitはベンゾニトリルからベンズアミドを1Mモル/分の速度で生成させる酵素活性として定義される。

#### 50 【0023】

【発明の効果】本発明により、ロドコッカス ロドクロウス J-1株の持つサブユニット $\alpha$ 及びサブユニット $\beta$ のアミノ酸配列を有し、ニトリルヒトラーゼ活性を有する2種類のポリペプチドをコードするDNA配列が明らかにされた。そして、このDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体が作出された。以上により、このニトリルヒトラーゼ遺伝子を菌体内に多コピー存在させ、菌体内酵素量を従来に比して飛躍的に増大させることができる。

【0024】

【配列表】

(vii) 配列:

5	10	15
MetSerGluHisValAsnLysTyrThrGluTyrGluAlaArgThr		
20	25	30
LysAlaIleGluThrLeuLeuTyrGluArgGlyLeuIleThrPro		
35	40	45
AlaAlaValAspArgValValSerTyrTyrGluAsnGluIleGly		
50	55	60
ProMetGlyGlyAlaLysValValAlaLysSerTrpValAspPro		
65	70	75
GluTyrArgLysTrpLeuGluGluAspAlaThrAlaAlaMetAla		
80	85	90
SerLeuGlyTyrAlaGlyGluGlnAlaHisGlnIleSerAlaVal		
95	100	105
PheAsnAspSerGlnThrHisHisValValValCysThrLeuCys		
110	115	120
SerCysTyrProTrpProValLeuGlyLeuProProAlaTrpTyr		
125	130	135
LysSerMetGluTyrArgSerArgValValAlaAspProArgGly		
140	145	150
ValLeuLysArgAspPheGlyPheAspIleProAspGluValGlu		
155	160	165
ValArgValTrpAspSerSerSerGluIleArgTyrIleValIle		
170	175	180
ProGluArgProAlaGlyThrAspGlyTrpSerGluGluGluLeu		
185	190	195
ThrLysLeuValSerArgAspSerMetIleGlyValSerAsnAla		
200		
LeuThrProGlnGluValIleVal		

【0025】

(2) 配列番号: 2

(i) 配列の長さ: 229

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

5	10	15
MetAspGlyIleHisAspThrGlyGlyMetThrGlyTyrGlyPro		
20	25	30

\* (1) 配列番号: 1

(i) 配列の長さ: 203

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

10

\* (a) 他の情報:  $\alpha^{(H)}$  - サブユニット

(v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報:  $\beta^{(H)}$  - サブユニット

ValProTyrGlnLysAspGluProPhePheHisTyrGluTrpGlu  
 35 40 45  
 GlyArgThrLeuSerIleLeuThrTrpMetHisLeuLysGlyIle  
 50 55 60  
 SerTrpTrpAspLysSerArgPhePheArgGluSerMetGlyAsn  
 65 70 75  
 GluAsnTyrValAsnGluIleArgAsnSerTyrTyrThrHisTrp  
 80 85 90  
 LeuSerAlaAlaGluArgIleLeuValAlaAspLysIleIleThr  
 95 100 105  
 GluGluGluArgLysHisArgValGlnGluIleLeuGluGlyArg  
 110 115 120  
 TyrThrAspArgLysProSerArgLysPheAspProAlaGlnIle  
 125 130 135  
 GluLysAlaIleGluArgLeuHisGluProHisSerLeuAlaLeu  
 140 145 150  
 ProGlyAlaGluProSerPheSerLeuGlyAspLysIleLysVal  
 155 160 165  
 LysSerMetAsnProLeuGlyHisThrArgCysProLysTyrVal  
 170 175 180  
 ArgAsnLysIleGlyGluIleValAlaTyrHisGlyCysGlnIle  
 185 190 195  
 TyrProGluSerSerSerAlaGlyLeuGlyAspAspProArgPro  
 200 205 210  
 LeuTyrThrValAlaPheSerAlaGlnGluLeuTrpGlyAspAsp  
 215 220 225  
 GlyAsnGlyLysAspValValCysValAspLeuTrpGluProTyr  
 LeuIleSerAla

【0026】

(3) 配列番号: 3

(i) 配列の長さ: 207

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

30 (v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報:  $\alpha^{(L)}$  -サブユニット

MetThrAlaHisAsnProValGlnGlyThrLeuProArgSerAsn  
 5 10 15  
 GluGluIleAlaAlaArgValLysAlaMetGluAlaIleLeuVal  
 20 25 30  
 AspLysGlyLeuIleSerThrAspAlaIleAspHisMetSerSer  
 35 40 45  
 ValTyrGluAsnGluValGlyProGlnLeuGlyAlaLysIleVal  
 50 55 60  
 AlaArgAlaTrpValAspProGluPheLysGlnArgLeuLeuThr  
 65 70 75  
 AspAlaThrSerAlaCysArgGluMetGlyValGlyGlyMetGln  
 80 85 90  
 GlyGluGluMetValValLeuGluAsnThrGlyThrValHisAsn  
 95 100 105

```

      110      115      120
MetValValCysThrLeuCysSerCysTyrProTrpProValLeu
      125      130      135
GlyLeuProProAsnTrpTyrLysTyrProAlaTyrArgAlaArg
      140      145      150
AlaValArgAspProArgGlyValLeuAlaGluPheGlyTyrThr
      155      160      165
ProAspProAspValGluIleArgIleTrpAspSerSerAlaGlu
      170      175      180
LeuArgTyrTrpValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGluAsn
      185      190      195
PheThrGluGluGlnLeuAlaAspLeuValThrArgAspSerLeu
      200      205
IleGlyValSerValProThrThrProSerLysAla

```

【0027】

(4) 配列番号: 4

(i) 配列の長さ: 226

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報:  $\beta^{(1)}$  -サブユニット

20

(vii) 配列:

```

      5      10      15
MetAspGlyIleHisAspLeuGlyGlyArgAlaGlyLeuGlyPro
      20      25      30
IleLysProGluSerAspGluProValPheHisSerAspTrpGlu
      35      40      45
ArgSerValLeuThrMetPheProAlaMetAlaLeuAlaGlyAla
      50      55      60
PheAsnLeuAspGlnPheArgGlyAlaMetGluGlnIleProPro
      65      70      75
HisAspTyrLeuThrSerGlnTyrTyrGluHisTrpMetHisAla
      80      85      90
MetIleHisHisGlyIleGluAlaGlyIlePheAspSerAspGlu
      95      100     105
LeuAspArgArgThrGlnTyrTyrMetAspHisProAspAspThr
      110     115     120
ThrProThrArgGlnAspProGlnLeuValGluThrIleSerGln
      125     130     135
LeuIleThrHisGlyAlaAspTyrArgArgProThrAspThrGlu
      140     145     150
AlaAlaPheAlaValGlyAspLysValIleValArgSerAspAla
      155     160     165
SerProAsnThrHisThrArgArgAlaGlyTyrValArgGlyArg
      170     175     180
ValGlyGluValValAlaThrHisGlyAlaTyrValPheProAsp
      185     190     195
ThrAsnAlaLeuGlyAlaGlyGluSerProGluHisLeuTyrThr
      200     205     210
ValArgPheSerAlaThrGluLeuTrpGlyGluProAlaAlaPro
      215     220     225

```

AsnValValAsnHisIleAspValPheGluProTyrLeuLeuPro

Ala

【0028】

(5) 配列番号：5

(i) 配列の長さ：609

(ii) 配列の型：核酸

(iii) 鎖の数：一本鎖

(iv) トポロジー：直鎖状

(viii) 配列：

```

      15      30      45
GTGAGCGAGCACGTCAATAAGTACACGGAGTACGAGGCACGTACC
      60      75      90
AAGGCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTCATCACGCCC
     105     120     135
GCCGCGGTGCGACCGAGTGGTTTCGTACTACGAGAACCAGATCGGC
     150     165     180
CCGATGGGCGGTGCCAAGGTCGTGGCCAAGTCTGGGTGGACCTT
     195     210     225
GAGTACCGCAAGTGGCTCGAAGAGGACGCGACGGCCGCGATGGCG
     240     255     270
TCATTGGGCTATGCCGGTGAGCAGGCACACCAAATTTGGCGGTC
     285     300     315
TTCAACGACTCCCAAACGCATCACGTGGTGGTGTGCACTCTGTGT
     330     345     360
TCGTGCTATCCGTGGCCGGTGCTTGGTCTCCCGCCCGCCTGGTAC
     375     390     405
AAGAGCATGGAGTACCGGTCCCGAGTGGTAGCGGACCCCTCGTGGA
     420     435     450
GTGCTCAAGCGCGATTTCGGTTTCGACATCCCGATGAGGTGGAG
     465     480     495
GTCAGGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTACATCGTCATC
     510     525     540
CCGGAACGGCCGGCCGGCACCACGCGTGGTCCGAGGAGGAGCTG
     555     570     585
ACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATCGGTGTCAGTAATGCG
     600
CTCACACCGCAGGAAGTGATCGTA

```

\* (v) 配列の種類：GenomicDNA

(iv) 起源

(a) 生物名：ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名：J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

\* (a) 他の情報： $\alpha^{(H)}$  -サブユニット

【0029】

(6) 配列番号：6

(i) 配列の長さ：687

(ii) 配列の型：核酸

(iii) 鎖の数：一本鎖

(iv) トポロジー：直鎖状

(v) 配列の種類：GenomicDNA

(viii) 配列：

```

      15      30      45
ATGGATGGTATCCACGACACAGGCGGCATGACCGGATACGGACCG
      60      75      90
GTCCCTATCAGAAGGACGAGCCCTTCTTCCACTACGAGTGGGAG

```

(vi) 起源

(a) 生物名：ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名：J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

(a) 他の情報： $\beta^{(H)}$  -サブユニット

105 120 135  
 GGTCCGACCCTGTCAATTCTGACTTGGATGCATCTCAAGGGCATA  
 150 165 180  
 TCGTGGTGGGACAAGTCGCGGTTCTTCCGGGAGTCGATGGGGAAC  
 195 210 225  
 GAAACTACGTCAACGAGATTCGCAACTCGTACTACACCCACTGG  
 240 255 270  
 CTGAGTGGGCAGAACGTATCCTCGTCGCCGACAAGATCATCACC  
 285 300 315  
 GAAGAAGAGCGAAAGCACCGTGTGCAAGAGATCCTTGAGGGTCGG  
 330 345 360  
 TACACGGACAGGAAGCCGTGCGGGAAGTTCGATCCGGCCCAGATC  
 375 390 405  
 GAGAAGGCGATCGAACGGCTTCACGAGCCCCACTCCCTAGCGCTT  
 420 435 450  
 CCAGGAGCGGAGCCGAGTTTCTCTCTCGGTGACAAGATCAAAGTG  
 465 480 495  
 AAGAGTATGAACCCGCTGGGACACACACGGTGCCCGAAATATGTG  
 510 525 540  
 CGGAACAAGATCGGGGAAATCGTCGCCTACCACGGCTGCCAGATC  
 555 570 585  
 TATCCCGAGAGCAGCTCGCCGGCCTCGGCGACGATCCTCGCCCG  
 600 615 630  
 CTCTACACGGTCCGTTTTCCGCCAGGAACTGTGGGGCGACGAC  
 645 660 675  
 GGAAACGGGAAAGACGTAGTGTGCGTCGATCTCTGGAACCGTAC  
 CTGATCTCTGCG

## 【0030】

(7) 配列番号: 7

(i) 配列の長さ: 621

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(viii) 配列:

15 30 45  
 ATGACCGCCCAATCCGTCCAGGGCACGTTGCCACGATCGAAC  
 60 75 90  
 GAGGAGATCGCCGCACGCGTGAAGGCCATGGAGGCCATCCTCGTC  
 105 120 135  
 GACAAGGGCCTGATCTCCACCGACGCCATCGACCACATGTCTCG  
 150 165 180  
 GTCTACGAGAACGAGGTGGTCTCAACTCGGCGCCAAGATCGTC  
 195 210 225  
 GCGCGCGCTGGGTGATCCCGAGTTCAAGCAGCGCCTGCTCACC  
 240 255 270  
 GACGCCACCGCGCTGCCGTGAAATGGGCGTCGGCGGCATGCAG  
 285 300 315  
 GGCGAAGAAATGGTCTGCTGGAAACACCGGCACGGTCCACAAC

(vi) 起源

30

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

(a) 他の情報:  $\alpha^{(L)}$  -サブユニット

```

      330      345      360
ATGGTCGTATGTACCTTGTGCTCGTGCTATCCGTGGCCGGTTCTC
      375      390      405
GGCCTGCCACCCAAGTGGTACAAGTACCCCGCCTACCGCGCCCGC
      420      435      450
GCTGTCCGCGACCCCGAGGTGTGCTGGCCGAATTCGGATATAACC
      465      480      495
CCCGACCCTGACGTCGAGATCCGGATATGGGACTCGAGTCCCGAA
      510      525      540
CTTCGCTACTGGGTCTTCCGCAACGCCAGCCGGCACCGAGAAC
      555      570      585
TTCACCGAAGAACAACCTCGCCGACCTCGTCACCCGCGACTCGCTC
      600      615
ATCGGCGTATCCGTCCCCACCACACCCAGCAAGGCC

```

【0031】

(vi) 起源

(8) 配列番号: 8

(i) 配列の長さ: 678

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(ii) 配列の型: 核酸

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(vii) 配列の特徴

(iv) トポロジー: 直鎖状

20 (a) 他の情報:  $\beta^{(1)}$  -サブユニット

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(viii) 配列:

```

      15      30      45
ATGGATGGAATCCACGACCTCGGTGGCCGCGCCGGCCTGGGTCCG
      60      75      90
ATCAAGCCCGAATCCGATGAACCTGTTTTCCATTCCGATTGGGAG
      105      120      135
CGGTCCGTTTTGACGATGTTCCCGGCGATGGCGCTGGCCGGCGCG
      150      165      180
TTCAATCTCGACCAGTTCCGGGGCGCGATGGAGCAGATCCCCCG
      195      210      225
CACGACTACCTGACCTCGCAATACTACGAGCACTGGATGCACGCG
      240      255      270
ATGATCCACCACGGCATCGAGGCGGGCATCTTCGATTCCGACGAA
      285      300      315
CTCGACCGCCGCACCCAGTACTACATGGACCATCCGGACGACACG
      330      345      360
ACCCCCACGCGGCAGGATCCGCAACTGGTGGAGACGATCTCGCAA
      375      390      405
CTGATCACCACGGAGCCGATTACCGACGCCCCGACCGACACCGAG
      420      435      450
GCCGCATTGCGCGTAGGCGACAAAGTCATCGTGCGGTGGACGCC
      465      480      495
TCACCGAACACCCACACCCGCGCGCGGATACGTCCGCGGTCTGT
      510      525      540
GTCGGCGAAGTCGTGGCGACCCACGGCGGTATGTCTTTCCGGAC
      555      570      585
ACCAACGCACTCGGCGCGCGGAAAGCCCCGAACACCTGTACACC
      600      615      630
GTGCGGTTCTCGGCGACCGAGTTGTGGGGTGAACCTGCCGCCCCG

```

615 660 675  
AACGTCGTCAATCACATCGACGTGTTCTGAACCGTATCTGCTACCG

GCC

## 【0032】

(9) 配列番号: 9

(i) 配列の長さ: 26

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

5 10 15  
Ser-Glu-His-Val-Asn-Lys-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Glu-Ala-Arg-Thr-Lys  
20 25  
Ala-Ile-Glu-Thr-Leu-Leu-Tyr-Glu-Arg-Gly-Leu

## \* (v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報:  $\alpha^{(H)}$  -サブユニット:  $\alpha_1^{(H)}$ 

\* 10

## 【0033】

(10) 配列番号: 10

(i) 配列の長さ: 28

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

5 10 15  
Met-Asp-Gly-Ile-His-Asp-Thr-Gly-Gly-Met-Thr-Gly-Tyr-Gly-Pro  
20 25  
Val-Pro-Tyr-Gln-Lys-Asp-Glu-Pro-Phe-Phe-His-Tyr-Glu

## ※ (v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

20 (vi) 配列の特徴

※ (a) 他の情報:  $\beta^{(H)}$  -サブユニット:  $\beta_1^{(H)}$ 

## 【0034】

(11) 配列番号: 11

(i) 配列の長さ: 15

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

5 10 15  
Thr-Ala-His-Asn-Pro-Val-Gln-Gly-Thr-Leu-Pro-Arg-?-Asn-Glu

## ★ (v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

30 (b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

★ (a) 他の情報:  $\alpha^{(L)}$  -サブユニット:  $\alpha_1^{(L)}$ 

## 【0035】

(12) 配列番号: 12

(i) 配列の長さ: 19

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

5 10 15  
Met-Asp-Gly-Ile-His-Asp-Leu-Gly-Gly-Arg-Ala-?-Leu-?-Pro

## ☆ (v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

40 (vi) 配列の特徴

☆ (a) 他の情報:  $\beta^{(L)}$  -サブユニット:  $\beta_1^{(L)}$ 

Ile-Lys-Pro-Glu

## 【0036】

(13) 配列番号: 13

(i) 配列の長さ: 2070

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

50 (vi) 起源

23

24

- (a) 生物名: ロドコッカス sp  
 (b) 株名: N-774 (FERM BP-1936)  
 (vii) 配列の特徴

No. 675~1295: サブユニットα  
 No. 1225 ~1960: サブユニットβ

## (viii) 配列:

SphI

GCATGCTTTCCACATCTGGAACGTGATCGCCACGGACGGTGGTG

50

CCTACCAGATGTTGGACGGCAACGGATACGGCATGAACGCCGAAG

100

GTTTGTACGATCCGGAACCTGATGGCACACTTTGCTTCTCGACGCA

150

TTCAGCACGCCGACGCTCTGTCCGAAACCGTCAAACTGGTGGCCC

200

TGACCGGCCACCACGGCATCACCACCCTCGGCGGCGGAGCTACG

250

GCAAAGCCCGGAACCTCGTACCGCTTGCCCGCGCGCCTACGACA

300

CTGCCTTGAGACAATTCGACGTCTGGTGATGCCAACGCTGCCCT

350

ACGTCGCATCCGAATTGCCGGCGAAGGACGTAGATCGTGCAACCT

400

TCATACCAAGGCTCTCGGGATGATCGCCAACACGGCACCATTCG

ACGTGACCGGACATCCGTCCCTGTCCGTTCGGCGCGCCTGGTGA

450

ACGGGGTTCCGGTCGGAATGATGATCACCGGCAGACACTTCGACG

500

HindIII

ATGCGACAGTCCTTCGTGTGGACGCGCATTCGAAAAGCTTCGCG

550

GCCGGTTTCCGACGCCGGCCGAACGCGCCTCCAACTCTGCACCAC

600

AACTCAGCCCCGCCTAGTCCTGACGCACTGTCAGACAACAAATTC

650

CACCGATTACACATGATCAGCCACATAAGAAAAGGTGAACCAG

700

ATGTCAGTAACGATCGACCACACAACGGAGAACGCCGACCCGGCC

MetSerValThrIleAspHisThrThrGluAsnAlaAlaProAla

Subunit α

750

CAGCGGGCGGTCTCCGACCGGGCGTGGGCACTGTTCCGCGCACTC

GlnAlaAlaValSerAspArgAlaTrpAlaLeuPheArgAlaLeu

Kpn I

800

GACGGTAAGGGATTGGTACCCGACGGTTACGTCGAGGGATGGAAG

AspGlyLysGlyLeuValProAspGlyTyrValGluGlyTrpLys

850

AAGACCTCCGAGGAGGACTTCAGTCCAAGGCGCGGAGCGGAATTG

LysThrSerGluGluAspPheSerProArgArgGlyAlaGluLeu

PvuII

GTAGCGCGCATGGACCGACCCGAGTTCGGCAGCTGCTTCTC

ValAlaArgAlaTrpThrAspProGluPheArgGlnLeuLeuLeu

900

Kpn I

ACCGACGGTACCGCCGAGTTGCCAGTACGGATACCTGGGCCCC  
ThrAspGlyThrAlaAlaValAlaGlnTyrGlyTyrLeuGlyPro

. 950

CAGGCGGCCTACATCGTGGCAGTCGAAGACACCCGACACTCAAG  
GlnAlaAlaTyrIleValAlaValGluAspThrProThrLeuLys

. 1000

AACGTGATCGTGTGCTCGCTGTGTTTCATGCACCGCGTGGCCCATC  
AsnValIleValCysSerLeuCysSerCysThrAlaTrpProIle

. 1050

CTCGGTCTGCCACCCACCTGGTACAAGAGCTTCGAATACCGTGCG  
LeuGlyLeuProProThrTrpTyrLysSerPheGluTyrArgAla

. 1100

CGCGTGGTCCGCGAACCACGGAAGGTTCTCTCCGAGATGGGAACC  
ArgValValArgGluProArgLysValLeuSerGluMetGlyThr

. 1150

GAGATCGCGTCGGACATCGAGATTCGCGTCTACGACACCACCGCC  
GluIleAlaSerAspIleGluIleArgValTyrAspThrThrAla

. 1200

GAAACTCGCTACATGGTCTCCCGCAGCGTCCCGCCGGCACCAGAA  
GluThrArgTyrMetValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGlu

Pst I

. 1250

GGCTGGAGCCAGGAACAACATGCAGGAAATCGTCACCAAGGACTGC  
GlyTrpSerGlnGluGlnLeuGlnGluIleValThrLysAspCys

. 1300

CTGATCGGGGTGCAATCCCGCAGGTTCCACCGTCTGATCACC  
LeuIleGlyValAlaIleProGlnValProThrValTRM

CGACAAGAAGGAAGCACACC-ATGGATGGAGTACACGATCTTGCC

MetAspGlyValHisAspLeuAla

Subunit  $\beta$ 

. 1350

GGAGTACAAGGCTTCGGCAAAGTCCCGCATACCGTCAACGCCGAC  
GlyValGlnGlyPheGlyLysValProHisThrValAsnAlaAsp

. 1400

ATCGGCCCCACCTTTACGCCGAATGGGAACACCTGCCCTACAGC  
IleGlyProThrPheHisAlaGluTrpGluHisLeuProTyrSer

. 1450

Sal I

CTGATGTTCCCGGTGTCGCCGAACCTCGGGCCTTCAGCGTCGAC  
LeuMetPheAlaGlyValAlaGluLeuGlyAlaPheSerValAsp

. 1500

GAAGTGCATACGTCGTCGAGCGGATGGAGCCGGGCCACTACATG  
GluValArgTyrValValGluArgMetGluProGlyHisTyrMet

. 1550

ATGACCCCGTACTACGAGAGGTACGTATCGGTGTCGCGACATTG  
MetThrProTyrTyrGluArgTyrValIleGlyValAlaThrLeu

. 1600

ATGGTCGAAAAGGGAATCCTGACGCAGGACGAACTCGAAAGCCTT  
MetValGluLysGlyIleLeuThrGlnAspGluLeuGluSerLeu

. 1650

GCGGGGGACCGTTCCCACTGTCACGGCCAGCGAATCCGAAGGG

AlaGlyGlyProPheProLeuSerArgProSerGluSerGluGly

. 1700

CGGCCGGCACCCGTCGAGACGACCACCTTCGAAGTCGGGCAGCGA  
ArgProAlaProValGluThrThrThrPheGluValGlyGlnArg

. 1750

GTACGCGTACGCGACGAGTACGTTCCGGGGCATATTCGAATGCCT  
ValArgValArgAspGluTyrValProGlyHisIleArgMetPro

GCATACTGCCGTGGACGAGTGGGAACCATCTCTCATCGAACTACC  
AlaTyrCysArgGlyArgValGlyThrIleSerHisArgThrThr

. 1800

GAGAAAGTGGCCGTTTCCCGACGCAATCGGCCACGGGCGCAACGAC  
GluLysTrpProPheProAspAlaIleGlyHisGlyArgAsnAsp

. 1850

GCCGGCGAAGAACCGACGTACCACGTGAAGTTCGCCGCCGAGGAA  
AlaGlyGluGluProThrTyrHisValLysPheAlaAlaGluGlu

. 1900

Sal I

TTGTTCCGTAGCGACACCGACGGTGAAGCGTCGTTGTCGACCTC  
LeuPheGlySerAspThrAspGlyGlySerValValValAspLeu

. 1950

TTCGAGGGTTACCTCGAGCCTGCGGCCTGATCTCCAGCATTCCA  
PheGluGlyTyrLeuGluProAlaAlaTRM

. 2000

GGCGGCGGTACGCGATCACAGCGGTTCTGTGCGACCGCCGCTGA

. 2050

TCACCACGATTCACTCATTCGGAAGGACACTGGAAATCATGGTCG  
Sal I

# 【0037】

(14) 配列番号: 14

(i) 配列の長さ: 1970

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

30 (b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

No. 408~1094: サブユニット  $\beta^{(H)}$

No. 1111 ~1719: サブユニット  $\alpha^{(H)}$

(viii) 配列:

```

      10      20      30      40      50      60 CT
GCAGCTCGAACATCGAAGGGTGGGAGCCGAGAGATCGGAGACGACACCCGGAGGG

      70      80      90     100     110     120
AACTTAGCCTCCCGGACCGATGCGTGTCCTGGCAACGCCTCAAAATTCAGTGCAAGCGAT

     130     140     150     160     170     180
TCAATCTTGTTACTTCCAGAACCGAATCACGTCCCCGTAGTGTGCGGGGAGAGCGCCCGA

     190     200     210     220     230     240
ACGCAGGGATGGTATCCATGCGCCCCCTTCTCTTTTCGAACGAGAACCGCCGGTACAGCC

     250     260     270     280     290     300
GACCCGGAGACACTGTGACGCGGTTCAACGATTGTTGTGCTGTGAAGGATTACCCAAGC

```

29

30

310 320 330 340 350 360  
CAACTGATATCGCCATTCCGTTGCCGGAACATTTGACACCTTCTCCCTACGAGTAGAAGC

370 380 390 400 410 420  
CAGCTGGACCCCTCTTTGAGCCCAGCTCCGATGAAAGGAATGAGGAAATGGATGGTATCC  
MetAspGlyIleH  
Subunit  $\beta^{(H)}$

430 440 450 460 470 480  
ACGACACAGCGGCATGACCGGATACGGACCGGTCCCTATCAGAAGGACGAGCCCTTCT  
isAspThrGlyGlyMetThrGlyTyrGlyProValProTyrGlnLysAspGluProPheP

490 500 510 520 530 540  
TCCACTACGAGTGGGAGGGTCGGACCCTGTCAATTCGACTTGGATGCATCTCAAGGGCA  
heHisTyrGluTrpGluGlyArgThrLeuSerIleLeuThrTrpMetHisLeuLysGlyI

550 560 570 580 590 600  
TATCGTGGTGGGACAAGTCGCGGTTCTCCGGGAGTCGATGGGGAACGAAACTACGTCA  
leSerTrpTrpAspLysSerArgPhePheArgGluSerMetGlyAsnGluAsnTyrValA

610 620 630 640 650 660  
ACGAGATTCGCAACTCGTACTACCCCACTGGCTGAGTGCGGCAGAACGTATCCTCGTCG  
snGluIleArgAsnSerTyrTyrThrHisTrpLeuSerAlaAlaGluArgIleLeuValA

670 680 690 700 710 720  
CCGACAAGATCATCACCGAAGAAGAGCGAAAGCACCGTGTGCAAGAGATCCTTGAGGGTC  
laAspLysIleIleThrGluGluGluArgLysHisArgValGlnGluIleLeuGluGlyA

730 740 750 760 770 780  
GGTACACGGACAGGAAGCCGTCGCGGAAGTTCGATCCGGCCCAGATCGAGAAGGCGATCG  
rgTyrThrAspArgLysProSerArgLysPheAspProAlaGlnIleGluLysAlaIleG

790 800 810 820 830 840  
AACGGCTTCACGAGCCCCACTCCCTAGCGCTCCAGGAGCGGAGCCGAGTTTCTCTCTCG  
luArgLeuHisGluProHisSerLeuAlaLeuProGlyAlaGluProSerPheSerLeuG

850 860 870 880 890 900  
GTGACAAGATCAAAGTGAAGAGTATGAACCCGCTGGGACACACACGGTGCCCGAAATATG  
lyAspLysIleLysValLysSerMetAsnProLeuGlyHisThrArgCysProLysTyrV

910 920 930 940 950 960  
TGCGGAACAAGATCGGGGAAATCGTCGCCTACCACGGCTGCCAGATCTATCCCGAGAGCA  
alArgAsnLysIleGlyGluIleValAlaTyrHisGlyCysGlnIleTyrProGluSerS

970 980 990 1000 1010 1020  
GCTCCGCGGCCTCGGCGACGATCCTCGCCCGCTCTACACGGTCGCGTTTTCCGCCAGG  
erSerAlaGlyLeuGlyAspAspProArgProLeuTyrThrValAlaPheSerAlaGlnG

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
AACTGTGGGCGACGACGGAACGGGAAAGACGTAGTGTGCGTCGATCTCTGGGAACCGT  
luLeuTrpGlyAspAspGlyAsnGlyLysAspValValCysValAspLeuTrpGluProT

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
ACCTGATCTCTGCGTGAAAGGAATACGATAGTGAGCGAGCACGTCAATAAGTACACGGAG  
yrLeuIleSerAla  
MetSerGluHisValAsnLysTyrThrGlu  
Subunit  $\alpha^{(H)}$

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
TACGAGGCACGTACCAAGGCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTCATCACGCC  
TyrGluAlaArgThrLysAlaIleGluThrLeuLeuTyrGluArgGlyLeuIleThrPro

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
GCCGCGGTCGACCGAGTCGTTTCGTACTACGAGAACGAGATCGGCCCGATGGGCGGTGCC  
AlaAlaValAspArgValValSerTyrTyrGluAsnGluIleGlyProMetGlyGlyAla

31

32

1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 AAGGTCGTGGCCAAGTCCTGGGTGGACCCTGAGTACCGCAAGTGGCTCGAAGAGGACGCG  
 LysValValAlaLysSerTrpValAspProGluTyrArgLysTrpLeuGluGluAspAla  
 1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 ACGGCCGCGATGGCGTCATTGGGCTATGCCGGTGAGCAGGCACACCAAATTTTCGGCGGTC  
 ThrAlaAlaMetAlaSerLeuGlyTyrAlaGlyGluGlnAlaHisGlnIleSerAlaVal  
 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 TTCAACGACTCCCAAACGCATCACGTGGTGGTGTGCACTCTGTGTTCTGTGCTATCCGTGG  
 PheAsnAspSerGlnThrHisHisValValValCysThrLeuCysSerCysTyrProTrp  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 CCGGTGCTTGGTCTCCCGCCCGCCTGGTACAAGAGCATGGAGTACCGGTCCCGAGTGGTA  
 ProValLeuGlyLeuProProAlaTrpTyrLysSerMetGluTyrArgSerArgValVal  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 GCGGACCCTCGTGGAGTGCTCAAGCGCGATTTCGGTTTCGACATCCCGATGAGGTGGAG  
 AlaAspProArgGlyValLeuLysArgAspPheGlyPheAspIleProAspGluValGlu  
 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 GTCAGGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTACATCGTCATCCCGAACGGCCGGCC  
 ValArgValTrpAspSerSerSerGluIleArgTyrIleValIleProGluArgProAla  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 GGCACCGACGGTTGGTCCGAGGAGGAGCTGACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATC  
 GlyThrAspGlyTrpSerGluGluGluLeuThrLysLeuValSerArgAspSerMetIle  
 1690 1700 1710 1720 1730 1740  
 GGTGTCAGTAATGCGCTCACACCGCAGGAAGTGATCGTATGAGTGAAGACACACTCACTG  
 GlyValSerAsnAlaLeuThrProGlnGluValIleVal  
 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
 ATCGGCTCCCGGCGACTGGGACCGCCGACCGCCCCGCGACAATGGCGAGCTTGTATTCA  
 1810 1820 1830 1840 1850 1860  
 CCGAGCCTTGGGAAGCAACGGCATTCCGGGTCGCCATCGCGCTTTCGGATCAGAAGTCGT  
 1870 1880 1890 1900 1910 1920  
 ACGAATGGGAGTTCTTCCGACAGCGTCTCATTCACTCCATCGCTGAGGCCAACGGTTGCG  
 1930 1940 1950 1960 1970  
 AGGCATACTACGAGAGCTGGACAAAGGCGCTCGAGGCCAGCGTGGTCGAC

## 【0038】

(15) 配列番号: 15

(i) 配列の長さ: 1731

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM・BP)

(vii) 配列の特徴

40 No. 171~848 : サブユニット  $\beta^{(L)}$ No. 915~1535 : サブユニット  $\alpha^{(L)}$ 

(viii) 配列:

10 20 30 40 50 60  
 GAGCTCCCTGGAGCCACTCGCGCCGACGCATCCACGCTCGGACAGCCCACGGTGCGGATC  
 70 80 90 100 110 120  
 ACCCTGTTCTGTCGGTAACAGAACAGTAACATGTCATCAGGTCATGACGTGTTGACGCAT  
 130 140 150 160 170 180  
 TAGACGAGGGCACATAGGGTTGGTGAATCACGGCACAAGGAGAGCATTTATGGATGGAA

33

34

MetAspGlyI  
Subunit  $\beta^{(L)}$ 

190 200 210 220 230 240  
 TCCACGACCTCGGTGGCCGCGCCGGCTGGGTCCGATCAAGCCCGAATCCGATGAACCTG  
 leHisAspLeuGlyGlyArgAlaGlyLeuGlyProIleLysProGluSerAspGluProV  
 250 260 270 280 290 300  
 TTTTCCATTCCGATTGGGAGCGGTTCGGTTTTGACGATGTTCCCGCGATGGCGCTGGCCG  
 alPheHisSerAspTrpGluArgSerValLeuThrMetPheProAlaMetAlaLeuAlaG  
 310 320 330 340 350 360  
 GCGCGTTCAATCTCGACCAGTTCCGGGGCGCGATGGAGCAGATCCCCCGCACGACTACC  
 lyAlaPheAsnLeuAspGlnPheArgGlyAlaMetGluGlnIleProProHisAspTyrL  
 370 380 390 400 410 420  
 TGACCTCGCAATACTACGAGCACTGGATGCACGCGATGATCCACCACGGCATCGAGGCGG  
 euThrSerGlnTyrTyrGluHisTrpMetHisAlaMetIleHisHisGlyIleGluAlaG  
 430 440 450 460 470 480  
 GCATCTTCGATTCCGACGAACCTCGACCGCCGACCCAGTACTACATGGACCATCCGACG  
 lyIlePheAspSerAspGluLeuAspArgArgThrGlnTyrTyrMetAspHisProAspA  
 490 500 510 520 530 540  
 ACACGACCCCCACGCGGCAGGATCCGCAACTGGTGGAGACGATCTCGCAACTGATCACCC  
 spThrThrProThrArgGlnAspProGlnLeuValGluThrIleSerGlnLeuIleThrH  
 550 560 570 580 590 600  
 ACGGAGCCGATTACCGACGCCCACCGACACCGAGGCCGATTGCGCGTAGGCGACAAAG  
 isGlyAlaAspTyrArgArgProThrAspThrGluAlaAlaPheAlaValGlyAspLysV  
 610 620 630 640 650 660  
 TCATCGTCCGGTCGGACGCCTCACCGAACCCACACCCGCCCGCCGGATACGTCCGCG  
 alIleValArgSerAspAlaSerProAsnThrHisThrArgArgAlaGlyTyrValArgG  
 670 680 690 700 710 720  
 GTCGTGTCGGCGAAGTCGTGGCGACCCACGGCGCGTATGTCTTCCGGACACCAACGCAC  
 lyArgValGlyGluValValAlaThrHisGlyAlaTyrValPheProAspThrAsnAlaL  
 730 740 750 760 770 780  
 TCGGCGCCGGCGAAAGCCCCGAACACCTGTACACCGTCCGGTTCTCGGCGACCGAGTTGT  
 euGlyAlaGlyGluSerProGluHisLeuTyrThrValArgPheSerAlaThrGluLeuT  
 790 800 810 820 830 840  
 GGGGTGAACCTGCCGCCCCGAACGTCGTCAATCACATCGACGTTCGAACCGTATCTGC  
 rpGlyGluProAlaAlaProAsnValValAsnHisIleAspValPheGluProTyrLeuL  
 850 860 870 880 890 900  
 TACCGGCCTGACCAGGTATCCGGTCCACCCAGCGAGACGTCCCTTCACCACAGACAGAA  
 euProAla

MetThrAlaHisAsnProValGlnGlyThrLeuProArgSerAsnG  
Subunit  $\alpha^{(L)}$ 

970 980 990 1000 1010 1020  
 AGGAGATCGCCGCACGCGTGAAGGCCATGGAGGCCATCCTCGTCGACAAGGGCCTGATCT  
 luGluIleAlaAlaArgValLysAlaMetGluAlaIleLeuValAspLysGlyLeuIleS  
 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 CCACCGACGCCATCGACCACATGTCTCGGTCTACGAGAACGAGGTCCGTCTCAACTCG  
 erThrAspAlaIleAspHisMetSerSerValTyrGluAsnGluValGlyProGlnLeuG  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 GCGCCAAGATCGTCGCCGCGCCTGGGTTCGATCCCGAGTTCAAGCAGCGCCTGCTCACCG

35

36

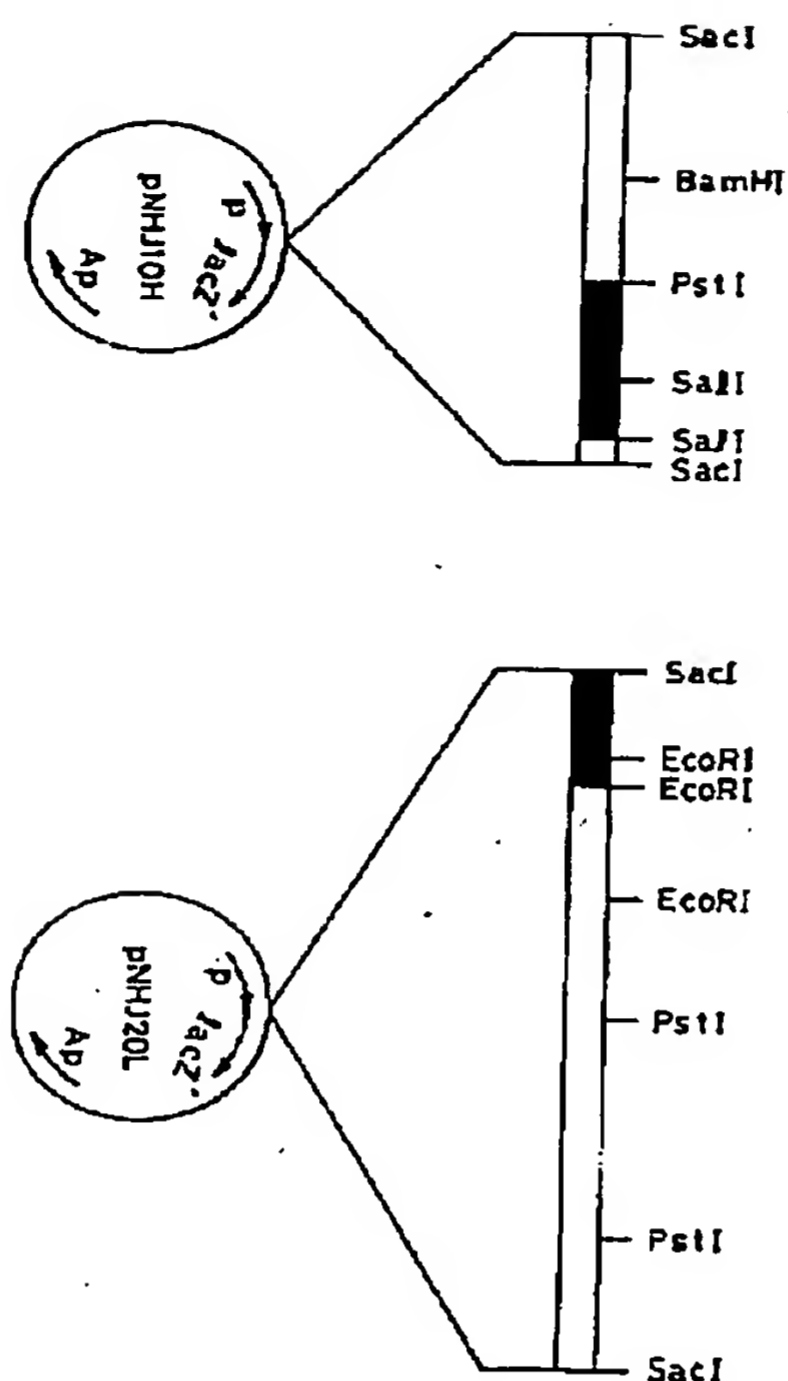
lyAlaLysIleValAlaArgAlaTrpValAspProGluPheLysGlnArgLeuLeuThrA  
 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 ACGCCAACCAGCGCCTGCCGTGAAATGGGCGTCGGCGGCATGCAGGGCGAAGAAATGGTCG  
 spAlaThrSerAlaCysArgGluMetGlyValGlyGlyMetGlnGlyGluGluMetValV  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 TGCTGGAAAACACCGGCACGGTCCACAACATGGTCGTATGTACCTTGTGCTCGTGCTATC  
 alLeuGluAsnThrGlyThrValHisAsnMetValValCysThrLeuCysSerCysTyrP  
 1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 CGTGGCCGGTTCTCGGCCTGCCACCAACTGGTACAAGTACCCCGCCTACCGCGCCCGCG  
 roTrpProValLeuGlyLeuProProAsnTrpTyrLysTyrProAlaTyrArgAlaArgA  
 1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 CTGTCCGCGACCCCGAGGTGTGCTGGCCGAATTCCGATATACCCCGACCTGACGTCG  
 laValArgAspProArgGlyValLeuAlaGluPheGlyTyrThrProAspProAspValG  
 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 AGATCCGGATATGGGACTCGAGTGCCGAACCTCGCTACTGGGTCTGCGCAACGCCAG  
 lulleArgIleTrpAspSerSerAlaGluLeuArgTyrTrpValLeuProGlnArgProA  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 CCGGCACCGAGAACTTCACCGAAGAACAACCTCGCCGACCTCGTCACCCGCGACTCGCTCA  
 laGlyThrGluAsnPheThrGluGluGlnLeuAlaAspLeuValThrArgAspSerLeuI  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 TCGGCGTATCCGTCCCCACACCCAGCAAGGCCTGACATGCCCGACTCAACGAACAA  
 leGlyValSerValProThrThrProSerLysAla  
 1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 CCCCACCCGGGTCTCGAAGCCAACCTCGGCGACCTGGTACAGAATCTGCCGTTCAACGAA  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 CGAATCCCCCGCGCTCCGGCGAGGTGCCTTCGATCAGGCCTGGGAGATCCGCGCCTTC  
 1690 1700 1710 1720 1730  
 AGCATTGCCACCGCATTGCATGGCCAGGGCCGATTCTGAATGGGACGAATTC

【図面の簡単な説明】

限酵素地図。

【図1】組換え体プラスミドpNHJ10H及びpNHJ20Lの制

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 13/02				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 西山 真  
東京都新宿区西落合二丁目16番11号

(72)発明者 長沢 透  
京都府京都市左京区高野東開町1-7  
(72)発明者 堀之内 末治  
千葉県千葉市弥生町1-170